



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102872456 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201210389058. 0

(22) 申请日 2002. 06. 07

(30) 优先权数据

60/302, 636 2001. 07. 02 US

(62) 分案原申请数据

02813344. 7 2002. 06. 07

(73) 专利权人 硕腾服务有限责任公司

地址 美国新泽西

(72) 发明人 R·L·凯赫 L·G·萨巴迪尼

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

A61K 39/116(2006. 01)

A61K 39/295(2006. 01)

A61P 31/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1181761A , 1998. 05. 13, 全文 .

CN 88101554A , 1998. 11. 02, 全文 .

CN 1296953A , 2001. 05. 30, 参见正文第 15

页第 26-29 行、第 16 页第 21-29 行、第 16 页第 12-13 行 .

金梅林 . 腹膜内接种疫苗控制猪肺炎支原体 . 《国外医学 . 预防 . 诊断 . 治疗用生物制品分册》. 1992, (第 6 期), 第 272-273 页 , 尤其参见第 1、3 段 .

金梅林 . 腹膜内接种疫苗控制猪肺炎支原体 . 《国外医学 . 预防 . 诊断 . 治疗用生物制品分册》. 1992, (第 6 期), 第 272-273 页 , 尤其参见第 1、3 段 .

审查员 程婷

权利要求书1页 说明书12页

(54) 发明名称

单剂量猪肺炎支原体疫苗

(57) 摘要

本发明涉及一种通过对约 3 至 10 日龄动物施以单剂有效量猪肺炎支原体 (M. hyo) 疫苗来治疗或预防由猪肺炎支原体感染所致动物疾病或病症的方法。所述猪肺炎支原体疫苗可以是完全或部分灭活细胞或改良活体制剂、亚单位疫苗、或核酸或 DNA 疫苗。根据本发明施用的猪肺炎支原体疫苗可用合成或重组方法制备。

1. 猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 菌苗在制备有效量的单剂量的疫苗中的用途,所述疫苗用于通过对3至10日龄的动物施用有效量的单剂量的疫苗治疗或预防因猪肺炎支原体感染而引发的所述动物的疾病或病症,其中所述疫苗能有效预防或减轻肺病灶,其中所述单剂量的猪肺炎支原体疫苗包含 1×10^8 至 5×10^{10} 变色单位 (CCU)。

2. 根据权利要求1的用途,其中所述动物是猪。

3. 根据权利要求1的用途,其中所述单剂量的猪肺炎支原体疫苗包含 5×10^8 至 5×10^{10} CCU。

4. 根据权利要求1的用途,其中所述疫苗的量是0.5至3.0ml。

5. 根据权利要求1的用途,其中所述猪肺炎支原体菌苗包含P-5722-3即NL1042株。

6. 根据权利要求5的用途,其中所述株用二元吡丙啶 (BEI) 灭活。

7. 根据权利要求6的用途,其中所述株用 AMPHIGEN™ 使其佐剂化。

8. 根据权利要求1的用途,其还包含猪肺炎支原体以外的病毒或细菌抗原。

9. 根据权利要求8的用途,其中所述病毒或细菌抗原选自猪流感病毒 (SIV)、猪生殖和呼吸疾病病毒或神秘猪病病毒 (PRRSV)、断奶后腹泻 (PWD) 病原体和猪增生性肠炎 (PPE) 病原体。

10. 根据权利要求1的用途,其中所述猪肺炎支原体疫苗适用于肌肉施用。

11. 根据权利要求1的用途,其还包含佐剂。

12. 根据权利要求1的用途,其中所述疫苗是 RESPISURE-1。

13. 根据权利要求12的用途,其中所述疫苗的量是1.5至2.5ml。

14. 根据权利要求13的用途,其中所述疫苗的量是2ml。

单剂量猪肺炎支原体疫苗

发明领域

[0001] 本发明涉及一种通过对约 3 至 10 日龄动物施以单剂有效量猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) (M. hyo) 疫苗来治疗或预防由猪肺炎支原体感染所致动物疾病或病症的方法。所述猪肺炎支原体疫苗可以是完全或部分灭活细胞或改良活体制剂、亚单位疫苗、或核酸或 DNA 疫苗。根据本发明施用的猪肺炎支原体疫苗可用合成或重组方法制备。

[0002] 发明背景

[0003] 猪肺炎支原体 (M. hyo) 是一种能引发猪地方性动物肺炎的细菌病原体。地方性动物肺炎是导致下列症状的慢性疾病：食物转化不良、发育障碍及继发性肺部感染易感性。猪肺炎支原体很容易通过呼吸道分泌物以及通过母猪 - 仔猪传递而进行传播，并在猪场中大规模流行。美国约有 99% 的猪群被感染，养猪业每年因此耗费约 3 亿美元。

[0004] 已知的抵御猪肺炎支原体的疫苗大多数都是基于含佐剂的猪肺炎支原体全细胞灭活制剂。此外，基于免疫原性多肽或蛋白质的疫苗可以通过猪肺炎支原体基因的克隆和重组表达的方法进行合成或制备。能够在体内表达所述多肽或蛋白质的猪肺炎支原体基因也可用作疫苗。

[0005] 全细胞灭活猪肺炎支原体疫苗的例子包括 RESPISURE 和 STELLAMUNE，其均可从美国辉瑞公司获得。

[0006] 另外，一些重组制备的可用作亚单位疫苗的猪肺炎支原体免疫原性多肽和蛋白质在本领域中已有描述。公开号为 W096/28472 的国际专利申请中描述了 6 种猪肺炎支原体蛋白抗原，其分子量分别为 46-48、52-54、60-64、72-75、90-94 和 110-114kDa，而且公开了分子量为 52-54、60-64 和 72-75kDa 的抗原的部分蛋白质序列以及分子量为 46-48kDa 的抗原的全长核苷酸序列和氨基酸序列。

[0007] 编码猪肺炎支原体蛋白质 P46 的基因，即 p46，也已经被 Futo 等人克隆 (1995; J. Bacteriol. 177:1915-1917)。该小组的研究表明体外表达的基因产物可用于诊断猪肺炎支原体感染的抗体免疫应答而不与其他种类的支原体发生交叉反应 (Futo 等, 1995; J. Clin. Microbiol. 33:680-683)。Futo 等人描述的 p46 基因的序列和诊断用途进一步公开于欧洲专利 0475185A1。

[0008] Wise 和 Kim (1987, J. Bacteriol., 169:5546-5555) 报道了名为 p70、p65 (P65, 同上)、p50 和 p44 的 4 种猪肺炎支原体膜整合蛋白质，后 3 种经共价脂连接而被修饰，可诱导强的体液免疫应答。对该免疫应答的保护效果未做研究。编码 P65 蛋白质的基因也已克隆，其序列和在疫苗及诊断中的用途已描述于美国专利 5, 788, 962。

[0009] 国际专利申请 W091/15593 公开了猪肺炎支原体的 5 种蛋白质，其表观分子量分别为 150、90、85、70 和 43kDa。其中提供了编码 85kDa 蛋白质 (蛋白质 C) 的编码基因的全长序列，以及编码其他 4 种蛋白质的部分核苷酸序列。

[0010] Faulds 的美国专利 US5, 252, 328 公开了免疫反应性猪肺炎支原体蛋白质的氨基末端序列，其分子量为 36、41、44、48、64、68、74. 5、79、88. 5、96 和 121kDa。其他根据电泳

迁移率鉴定的而未公开蛋白质序列的蛋白质的表观分子量为 22.5、34 和 52kDa。尽管 US 5, 252, 328 提及这些蛋白质可用于疫苗制剂,但未报道任何疫苗实验结果。

[0011] 国际专利申请 WO 95/09870 公开了纯化猪肺炎支原体粘附素的生化方法,所述粘附素是支原体的膜整合蛋白,负责粘附到宿主的上呼吸道上皮细胞的纤毛上。WO 95/09870 也建议了这些蛋白质的测试方法及用途,例如在疫苗和诊断方面的用途。

[0012] King 等人的研究论文(1997;Vaccine 15:25-35)公开的分子量为 124kDa 的粘附素 Mhp1 是 P97 的一个菌株变体。

[0013] Wilton 等人(1998, Microbiology 144:1931-1943)测定出了 P97 的一种 94kDa 变体。此外,研究表明 p97 基因是还编码名为 P102 的第二种蛋白质的操纵子的一部分,该第二种蛋白质的推测分子量约 102kDa (Hsu 等, 1998, Gene 214:13-23)。Minion 和 Hsu 在国际专利申请 WO 99/26664 中提出 P102 可用于疫苗,但未报道疫苗实验。

[0014] 没有任何一种已知的猪肺炎支原体疫苗被报道在对大约 3-10 日龄的猪施以单剂量治疗时是有效的。这样的疫苗将消除对多剂量的需求,并因此大大减少世界范围内猪群大规模接种疫苗相关的费用和劳动力。因此需要一种对约 3 至 10 日龄猪施以单剂量疫苗接种以有效地保护和预防由猪肺炎支原体感染所致疾病或病症的猪肺炎支原体疫苗。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明提供一种治疗或预防由猪肺炎支原体感染所致动物疾病或病症的方法,所述方法包括对约 3 至 10 日龄动物施以单剂有效量的猪肺炎支原体疫苗。

[0017] 本发明方法可消除对额外剂量的需求,所述额外剂量旨在产生或维持抵御猪肺炎支原体的免疫力。本发明的单疫苗接种方法能为血清反应阴性和血清反应阳性的猪提供抵御毒性猪肺炎支原体的保护。本发明方法能有效地治疗或预防由猪肺炎支原体感染导致的症状,例如预防和减轻猪肺的病灶。

[0018] 本发明方法包括对猪施以单剂有效量的猪肺炎支原体疫苗,所述疫苗包含完全或部分细胞制剂(如菌苗或改良活体制剂),亚单位疫苗,例如这样一种亚单位疫苗,其包含一个或多个猪肺炎支原体衍生多肽或蛋白质或者所述多肽或蛋白质的免疫原性片段,或编码所述多肽、蛋白质或免疫原性片段的一个或多个猪肺炎支原体基因,所述基因或核酸能在体内进行表达。猪肺炎支原体疫苗中提供的猪肺炎支原体多肽、蛋白质及其免疫原性片段和基因或核酸可以用本领域公知技术来合成或重组制备。

[0019] 根据本发明施用的猪肺炎支原体疫苗可包括附加成分,如佐剂。可以使用的多种佐剂包括那些此处描述的以及本领域公知的。

[0020] 发明详述

[0021] 本发明包括一种治疗或预防由猪肺炎支原体感染所致动物疾病或病症的方法,所述方法包括对约 3 至 10 日龄动物施以单剂有效量猪肺炎支原体疫苗。

[0022] 本发明的单剂疫苗接种方法可消除对猪施用额外剂量的需求,该额外剂量旨在产生和 / 或维持抵御猪肺炎支原体的免疫力。

[0023] 为清楚公开,并且非限制性的,对本发明的详细描述将分成如下几个部分,各部分描述或说明某些特征、实施例或发明的应用。

[0024] 某些实施例中,本发明方法中所使用的疫苗包括部分或全细胞猪肺炎支原体灭活制剂(菌苗)或改良活体疫苗以及药物学上可接受的载体,或者部分或全细胞猪肺炎支原

体灭活制剂（菌苗）或改良活体疫苗以及佐剂。

[0025] 在其他一些具体实施例中，本发明的方法中所使用的疫苗包括免疫原性蛋白质或多肽或其片段以及药物学上可接受的载体，或者免疫原性蛋白质或多肽或其片段以及佐剂。

[0026] 定义及缩写

[0027] 术语“治疗或预防”在涉及猪肺炎支原体感染时是指抑制猪肺炎支原体细菌的复制、抑制猪肺炎支原体的传播、或防止猪肺炎支原体在其宿主体内定居，以及减轻猪肺炎支原体感染所致疾病或病症的症状。如果细菌荷载体量减少、肺部感染减轻和 / 或摄食量和 / 或生长增加，那么就可以认为所述治疗达到了治疗效果。本发明方法能例如有效预防或减轻肺病灶。

[0028] 术语“猪肺炎支原体疫苗”是指能够用于预防或治疗由猪肺炎支原体感染所致病症或疾病的疫苗，该疫苗可包括任何能够有效治疗或预防猪受猪肺炎支原体感染的疫苗。能够用于本发明的猪肺炎支原体疫苗包括，例如，完全或部分猪肺炎支原体细胞制剂、灭活或改良活体疫苗、亚单位疫苗，所述亚单位疫苗含有一个或多个猪肺炎支原体衍生的多肽或蛋白质或所述多肽或蛋白质的免疫原性片段、或者编码一个或多个猪肺炎支原体衍生多肽或蛋白质、或其免疫原性片段的一个或多个猪肺炎支原体基因或核酸，且所述基因或核酸能够在猪体内表达。猪肺炎支原体多肽、蛋白质、所述多肽和蛋白质的免疫原性片段、或猪肺炎支原体基因或核酸可用本领域公知技术合成或重组制备。优选的，本发明的方法使用的猪肺炎支原体疫苗为菌苗。

[0029] 术语“动物”是指全部非人类动物，包括哺乳动物。

[0030] 术语“猪”是指小猪(piglets), swine, pigs, porcine, 大母猪(sows), 小母猪(gilts), barrows, 公猪(boars) 以及猪科的成员。

[0031] 优选地，本发明的方法施用于非人类哺乳动物，最优选的，猪。

[0032] 术语“菌苗”是指适用于疫苗用途的灭活的完全或部分猪肺炎支原体细胞制剂。

[0033] 术语“有效量”是指足以在其施用的受试者体内激发产生免疫应答的猪肺炎支原体疫苗的量。所述免疫应答可以包括但不限于，内在的、细胞的和 / 或体液的免疫的诱导。

[0034] 灭活（部分或全细胞）及改良活体疫苗

[0035] 用于本发明方法的传统灭活或改良活体疫苗的制备方法是本领域公知的。

[0036] 本发明所述的单剂量疫苗接种方法所施用的猪肺炎支原体菌苗可获自多种公众可用的来源。例如，猪肺炎支原体菌苗可从猪肺炎支原体分离物中制取。猪肺炎支原体的很多分离物对本领域普通技术人员来说均为熟知的并可获自，例如：美国典型培养物保藏中心，10801Boulevard 大学，马纳萨斯(Manassas), VA 20110-2209。包括例如：ATTC 序号为 25095, 25617, 25934, 27714 和 27715。

[0037] 猪肺炎支原体分离物还可用已知技术直接获自自然或实验感染的猪的肺损伤组织。

[0038] 猪肺炎支原体分离物可用多种已知方法进行灭活，例如，用美国专利 5, 565, 205 中公开的二元吡丙啶 (BEI) 处理细菌分离物、或用如福尔马林、热、BPL、放射或戊二醛进行灭活。

[0039] 适用于本发明方法的猪肺炎支原体菌苗还可获自多种商业来源。该来源包括但不

限于:RESPIFEND(Fort Dodge, 美国家庭用品公司),HYORESP(梅里亚公司),M+PAC(先灵葆雅公司),PROSYSTEM M(Intervet),INGLEVAC M(Boehringer),RESPISURE(辉瑞公司),和STELLAMUNE MYCOPLASMA(辉瑞公司)。

[0040] 用于本发明方法的优选的猪肺炎支原体菌苗来源为:RESPISURE 和 STELLAMUNE MYCOPLASMA。

[0041] 用于本发明方法的特别优选的猪肺炎支原体菌苗来源为 RESPISURE-1(辉瑞公司), 包含株系 P-5722-3(NL1042), 获自美国普度大学。

[0042] 优选地, P-5722-3 株用 BEI 灭活并且选用商业可获得的佐剂, 优选 AMPHIGEN(Hydrionics, 美国) 使其佐剂化。优选剂量为 2.0ml。常用防腐剂包括硫柳汞/EDTA。可以加入载体, 优选为 PBS。制备改良活体疫苗的方法, 如经培养传代以减低毒株的毒性, 是本领域熟知的。

[0043] 亚单位疫苗

[0044] 本发明方法的实施可以使用含有纯化的猪肺炎支原体免疫原性蛋白质, 多肽及所述蛋白和多肽的免疫原性片段。所述蛋白质和多肽可以用本领域公知技术进行制备。另外, 可以采用本领域技术人员所熟知的方法测定蛋白质纯度或均质性, 例如, 先对样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后再观测染色凝胶上的单个多肽条带。可以使用 HPLC 或其他本领域熟知的相似方法进行更高的分辨率测定。

[0045] 在一个具体的实施例中, 用于本发明的疫苗包含至少一种猪肺炎支原体蛋白质, 如, 但不限于, P46, P65, P97, P102, P70, P50 和 P44。

[0046] 在另一个实施例中, 用于本发明方法的疫苗包含猪肺炎支原体菌苗(灭活的完全或部分细胞或改良活体)或猪肺炎支原体蛋白质或多肽或其免疫原性片段和至少另外一种免疫原(灭活的完全或部分细胞 或改良活体)或免疫原性或抗原性蛋白质、多肽或其免疫原性片段, 优选为病毒、细菌或寄生虫多肽。所述另外的病原和蛋白质、多肽或其免疫原性片段包括, 但不限于猪流感病毒(SIV), 猪生殖和呼吸疾病病毒(porcine reproductive and respiratory disease virus, PRRS 或神秘猪病(mystery swine disease)), 断奶后腹泻(post-weaning diarrhea, PWD) 和猪增生性肠炎(porcine proliferative enteritis, PPE)。该组合物作为联合疫苗是有益的。

[0047] 在另一个具体的实施例中, 所述蛋白质或多肽的免疫原性片段含有用于本发明方法的免疫原性蛋白质和多肽(包括但不限于 P46, P65, P97, P102, P70, P50 和 P44)中至少 10、至少 20、至少 30、至少 40、至少 50 或至少 100 个连续氨基酸。

[0048] 此外, 用于疫苗的猪肺炎支原体蛋白为基本纯化的或均质的。本发明方法所采用的蛋白质或多肽一般是从表达编码这些蛋白质的重组核苷酸的宿主细胞中纯化得来的。所述蛋白质的纯化可通过本领域熟知的多种方法实施。参见, 比如, "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc., San Diego, "蛋白质纯化: 原理和方法", 1982, Springer-Verlag, New York 中所述的技术。

[0049] 纯化的猪肺炎支原体多肽和蛋白质以及其免疫原性片段还可用已知的合成方法来制备。

[0050] 疫苗制剂

[0051] 用于本发明的疫苗的合适制剂包括可注射的液体溶液或悬浮液; 也可以是在注射

前适合溶于或悬浮于液体中的固体形式。也可以制成乳化剂。所述活性免疫原成分常与药物学上可接受并能与该活性成分匹配的佐剂相混合。

[0052] 可以将所述多肽配制成中性或盐类的疫苗形式。药物学上可接受的盐类包括酸加成盐(与所述肽游离氨基基团形成的)以及与无机酸形成的盐类,所述无机酸如,盐酸或磷酸,或与乙酸、草酸、酒石酸、马来酸等有机酸形成的盐。与游离的羧基形成的盐类也可以衍生自氢 氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、或氢氧化三铁等无机碱,以及异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等有机碱。

[0053] 本发明所述的疫苗制剂含有免疫有效量的猪肺炎支原体免疫原和药物学上可接受的载体。疫苗制剂包含免疫有效量的一种或多种抗原以及药物学上可接受的载体。药物学上可接受的载体是本领域所熟知的,包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、无菌的等渗含水缓冲液及其组合。这种可接受载体的一个实例是含有一种或多种稳定剂的生理平衡培养基,所述稳定剂如稳定的水解蛋白、乳糖等。优选该载体是无菌的。制剂形式应该适合所述的施用方式。

[0054] 可以用标准方法将纯化后的抗原用于疫苗制剂。例如应该将所述纯化蛋白质调整到一合适的浓度,配以任一合适的疫苗佐剂并包装。合适的佐剂包括,但不限于:矿物凝胶,例如氢氧化铝;表面活性剂,例如溶血卵磷脂;糖甙,例如皂甙和 Quil A 或 GPI-0100 等皂甙衍生物;阳离子表面活性剂,例如 DDA (quaternary hydrocarbon ammonium halogenide);Pluronic 多元醇;聚阴离子和多原子离子;聚丙烯酸,非离子嵌段多聚物,例如 Pluronic F-127 (B. A. S. F., USA);Avridine 和 Rantidine;肽;重组突变不稳定毒素,例如白细胞毒素 (rmLT) 或霍乱毒素 (CT);化学结合或近分子转运体 (chemically bound or close proximity molecular transporters);矿物油,例如 Montanide ISA-50 (Seppic, Paris, France);聚羧乙烯, Amphigen (Hydronics, 美国), Omaha, NE. 美国, Alhydrogel, (Superfos Bisector, Frederikssund, Denmark) 油类乳状液 (oil emulsions), 例如 Bayol F/Arlacel A 等矿物油与水的乳状液,或者植物油、水和乳化剂如卵磷脂的乳状液;明矾, MDP, N-乙酰-胞壁酰-L-苏氨酸-D-异谷氨酸酰胺 (thr MDP), N-乙酰-去甲 (nor)-胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸酰胺, N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸-D-异谷氨酸酰胺-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰-sn-甘油基-3-羟基磷酸氧基)-乙胺;胆固醇细胞因子及佐剂的组合物。多原子离子可作为分散剂、增稠剂、抗结块剂,从而使疫苗在延长的沉淀期后重悬为单分散悬液。佐剂组合物可以是水剂,胶囊(控释或缓释)或微胶囊等形式。

[0055] 也可以将所述免疫原引入到脂质体中,或者偶联到多糖和/或其它可用于疫苗制剂的聚合物上。当重组抗原是一种半抗原,即具有抗原性因而能与相关抗体选择性反应,但不具有免疫原性因而不能激发免疫应答的分子时,可以将所述半抗原共价偶联到一种载体或免疫原性分子上;例如,血清白蛋白等大分子蛋白可赋予与其偶联的半抗原免疫原性。可以配制所述半抗原-载体用作疫苗。

[0056] 基因和核酸疫苗

[0057] 本发明可以使用编码免疫原性蛋白,多肽及所述蛋白质和多肽的免疫原性片段的猪肺炎支原体基因或核酸。该基因和核酸可在体内表达而且可以用本领域熟知方法进行制备。

[0058] 在一个具体实施例中,用于本发明的疫苗包含至少一种基因或核酸,所述基因或核酸编码猪肺炎支原体蛋白,例如,但不限于,P46, P65, P97, P102, P70, P50 和 P44。

[0059] 在另一个具体实施例中,本发明中使用的基因或核酸编码猪肺炎支原体蛋白或多肽的免疫原性片段,所述免疫原性片段含有本发明中所采用的免疫原性蛋白和多肽的至少 10、至少 20、至少 30、至少 40、至少 50、或至少 100 连续氨基酸,所述免疫原性蛋白或多肽包括,但不限于 P46, P65, P97, P102, P70, P50 和 P44。

[0060] 在本发明方法的另一些实施例中,基因或核酸用本领域熟知方法来施用,例如,使用基因枪。

[0061] 在本发明方法的另一些实施例中,所使用的基因或核酸为 DNA 疫苗。此外,该核酸或基因可与脂质体或本领域熟知的其它促进转染的因子联合使用。

[0062] 用于制备和传递 DNA 疫苗的方法是本领域熟知的。参见,例如, Krishnan, B. R, “DNA 疫苗在兽医学中的现状”Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier Science (2000)。

[0063] 表达系统

[0064] 可以用多种的宿主表达载体系统来表达本发明所述的抗原性蛋白质序列。这类宿主表达系统可以是目的编码序列可以从中产生并随后纯化的载体,也可以是当用合适的核苷酸编码序列转化或转染后能够在原位展示出本发明的猪肺炎支原体基因产物的细胞。这些包括但不限于微生物,例如用含有 mhp3 编码序列的重组噬菌体 DNA、质粒 DNA 或粘粒 DNA 表达载体转化的细菌(例如,大肠杆菌、枯草芽胞杆菌);用含有猪肺炎支原体基因产物编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,糖酵母、毕赤氏酵母);用含有猪肺炎支原体编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒, CaMV ;烟草花叶病毒, TMV)感染或用含有猪肺炎支原体编码序列的重组质粒表达载体(例如, Ti 质粒)转化的植物细胞系统;或者用含有取自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或哺乳动物病毒启动子(如腺病毒晚期启动子、牛痘病毒 7.5K 启动子)的重组表达构建体转化的哺乳动物细胞系统(例如, COS、CHO、BHK、293、3T 3)。在一个优选实施例中,所述表达载体是细菌系统。

[0065] 猪肺炎支原体多肽和蛋白质及其免疫原性片段还可用活体重组病毒和细菌载体比如腺病毒或沙门氏菌。实际使用的载体也是本领域熟知且容易获得的或可由本领域技术人员使用本领域熟知方法构建。

[0066] 剂量和施用方法

[0067] 根据本发明,对约 3-10 日龄的猪施以单剂有效量的猪肺炎支原体可提供抵御随后猪肺炎支原体攻击的有效免疫力。优选的,对约 6-约 8 日龄的猪施以猪肺炎支原体疫苗。最为优选的,对约 7 日龄的猪施以猪肺炎支原体疫苗。

[0068] 单次剂量实施中猪肺炎支原体菌苗疫苗的有效剂量为每剂中包含约 1×10^6 至约 5×10^{10} 变色单位(color changing unit) (CCU)。 优选的,能提供有效免疫力的猪肺炎支原体菌苗疫苗单剂包含 1×10^8 至约 5×10^{10} CCU 及更优选的,约 5×10^8 至 5×10^{10} CCU。

[0069] 根据本发明,当使用优选的菌苗产品 RESPISURE-1 时,单剂施用 RESPI SURE-1 的量为约 0.5-3.0ml,优选的约 1.5ml 至约 2.5ml,更优选的,约 2ml。

[0070] 本发明包含一个或多个蛋白或多肽或所述蛋白或多肽的免疫原性片段的猪肺炎

支原体亚单位疫苗的有效量为约 0.01 μg 至约 200 μg 。

[0071] 本发明包含一个或多个编码免疫原性蛋白或多肽或所述蛋白或多肽的免疫原性片段的猪肺炎支原体基因或核酸(优选 DNA)的猪肺炎支原体疫苗的有效量为约 0.1 μg 至约 200mg。

[0072] 根据本发明,疫苗的施用可以采用本领域所熟知的途径,包括口腔、皮内、肌内、粘膜局部、经皮和肠胃外(例如,静脉内的,腹膜内的,皮内的,皮下,肌肉内)。还可以使用无针头的传递装置进行施用。施用还可以通过联合途径完成,如,首次施用采用肠胃外途径,随后的施用采用粘膜途径。优选的施用途径为肌内施用。

[0073] 本发明疫苗的有效剂量(免疫剂量)还可以根据模型测试系统中的剂量-反应曲线中推出。

[0074] 本发明接种疫苗的方法为血清反应阳性和血清反应阴性的小猪均可提供针对猪肺炎支原体的保护性免疫力。血清反应阳性的小猪是指血清中含有抗猪肺炎支原体抗体的小猪。血清反应阴性的小猪是指血清中不含可检测水平的抗猪肺炎支原体抗体的小猪。

[0075] 本发明进一步描述于,但不限于,下列实施例中。

[0076] 实施例 1

[0077] 猪肺炎支原体菌苗的制备

[0078] 猪肺炎支原体 NL1042 株用二元吡丙啶 (BEI) 进行灭活。

[0079] 在生长期末,将培养物的 pH 调高至 7.8 ± 0.2 ,并保持 pH 在此范围内至少一小时。在此期间,加入经滤过灭菌处理的 2-溴乙基铵氢溴酸盐 (2-BromoEthylAminehydrobromide) (BEA) 水溶液至终浓度约 4.0mM。在提高的 pH 下,BEA 会化学转化为 BE I。培养物于 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 下持续搅拌温育至少 24 小时。

[0080] 温育 24 小时后,加入经滤过灭菌处理的硫代硫酸钠水溶液至终浓度约 4mM 以中和过剩的 BEI。再将培养物于 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 下持续搅拌温育 24 小时。

[0081] 灭活后,但在用硫代硫酸钠中和前,取样品并检测灭活完成情况。将含有 0.0026% 酚红的新培养基用 5-20% 接种体接种,并在检测颜色改变前在 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 下至少孵育一周,所述颜色改变为灭活失败的表现。大量样本在 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 的巯基醋酸盐培养液中,和室温下的胰酪胨培养液中,检测无菌状态。灭活的培养物移入灭菌储存容器中并在组装前保存于 $2-8^\circ\text{C}$ 下。

[0082] 通过体外血清学实验定量最终容器中的抗原以测定效价。用于功效研究中的疫苗效价决定了在失效期时疫苗所必须表现的最小活性。

[0083] 每一系列或第一亚系的完成产品的整体或最终容器样品用下述方法进行猪肺炎支原体的检测。

[0084] 菌苗保存于 -50°C 的 100ml 的小瓶。小瓶解冻后,等分为 15ml 并在使用前保存于 $5+/-2^\circ\text{C}$ 。

[0085] 为检测组装系列的效价,该组装系列的一个样本与参照物进行比较,并确定这一组装系列的 RP 单位值。组装系列或组装亚系在起始时优选包含至少 6.33RP,并且在整个期间至少为 5.06RP。

[0086] RP 指的是相对效价。可以用与参照疫苗相比较的相对抗原量来测定 RP 值。在本申请中,将参照疫苗 RP 值确定为 1。本发明单剂量产品优选具有 6.33RP 值,即为参照疫苗

的 6.33 倍。

[0087] 加入硫柳汞(Merthiolate)作为防腐剂,终浓度不要超过 0.01%(w/v)。

[0088] 加入 10% 乙二胺四乙酸(EDTA, 二钠盐或四钠盐)溶液作为防腐剂,终浓度大约为 0.07%(w/v)。

[0089] 实施例 2

[0090] 动物

[0091] 大约 1 周龄的猪被选用以接种疫苗。其猪肺炎支原体血清状况用 ELISA 实验进行测定。ELISA 值 ≤ 0.50 的猪为猪肺炎支原体阴性。ELISA 值大于 0.50 的猪为猪肺炎支原体血清阳性。

[0092] 疫苗

[0093] 猪肺炎支原体菌苗 RESPISURE-1 (辉瑞公司)用来给猪免疫接种。使用该疫苗前,用与参照猪肺炎支原体菌苗相比较的相对抗原量来确定其效价。参照疫苗(RP=1.0) 每剂量包含大约 8000 单位的抗原(在灭活前收获的存活细胞的大约 $1 - 2 \times 10^8$ CCU),用能测定疫苗中猪肺炎支原体抗原的固相免疫实验对其进行检测。

[0094] 在制备 RESPISURE-1 中使用的同一液体佐剂(AMPHIGEN)用作安慰剂(即,没有细菌细胞。)

[0095] 攻击接种体(challenge inoculum)

[0096] 以 10ml 均分的肺组织匀浆形式提供的攻击接种体,冻于 -70°C , 并被视为猪肺炎支原体株 11 (L136) 的衍生物。解冻该接种体并用 Friis Mycoplasma Broth 稀释为 1:25 的稀释液,并在接种前保持冰浴。每只猪在以下每个实施例中的特定日时经鼻接受 5ml 的剂量(每个鼻孔 2.5ml 的 1:25 悬液)。攻击的每一天,肺接种体的一等份要进行培育以确定不存在细菌的感染。其后在三天中的每一天,用滴定法测定第二等分,结果显示了接种体包含大约 10^6-10^7 变色单位(CCU) 的猪肺炎支原体。

[0097] 实验步骤

[0098] 猪在母猪体上时即用耳部标记进行识别 [(-1)天]。该猪按照普遍随机分组法被分配至围栏中和治疗组中。猪的分组是基于窝和断奶围栏进行的。

[0099] 在第 0 天,猪经肌内接种 2ml 剂量的猪肺炎支原体菌苗 RESPISURE-1 (辉瑞公司),或经肌内接种 2ml 剂量的安慰剂。每只猪在以下每个实施例中的特定日时经鼻接受 5ml 剂量的 1:25 悬液。全部猪每天都要监测和检查疾病的临床症状。

[0100] 在攻击第 1 天后的特定时间,无痛处死全部猪并作尸检。取出肺 并进行评测。尸检测定包括评估支原体呼吸系统疾病相关的病理程度。

[0101] 每一片肺叶都要检测,并画出病灶的草图以评估其占每片肺叶的百分比。并记录总的病灶程度。

[0102] 数据分析

[0103] 根据猪肺炎支原体感染的典型肺病灶百分比来评估功效。治疗组(接种组)中猪的全部肺病灶的百分比显著($P \leq 0.05$) 小于安慰剂组中的猪。

[0104] 总病变肺百分率

[0105] 每片肺叶的百分数用下面的单个肺叶与肺总质量的比例来加权平均:左头叶 10%,左中叶 10%,左尾叶 25%。右头叶 10%,右中叶 10%,右尾叶 25%,其他为 10%。然后将加

权的肺叶值相加即可得出总病变肺百分率(Pointon 等, 1992)。

[0106] 实施例 3

[0107] 评测猪抵御毒性猪肺炎支原体攻击的保护作用, 所述猪为于 3-8 日龄施以单剂量猪肺炎支原体菌苗 RESPISURE-1 (辉瑞公司) 的猪肺炎支原体血清型阳性的猪。

[0108] 在疫苗接种时或其前后, 对 RESPISURE-1 进行五个复制效价测定实验。用与疫苗参照物相比的相对抗原量来测定相对效价 (RP)。疫苗参照物的 RP=1.0, 包含大约 8000 单位的猪肺炎支原体抗原。五项实验的 RP 值分别为 5.42, 3.96, 4.71, 5.49 和 4.36。

[0109] 第 0 天, T02 治疗组中的猪(见下面表 1) 经肌内接种剂量为 2ml 的猪肺炎支原体菌苗 RESPISURE-1 (辉瑞公司)。T01 组中的猪经肌内接种剂量为 2ml 的安慰剂。在第 178, 179 和 180 天, 每只猪均经鼻接种剂量为 5ml 的 1:25 的攻击接种体悬液。这三天中的每一天, 在接种时培养一等份攻击物, 以确定不含细菌污染。第二等份用反滴定法来确定攻击物中大约 10^7 CCU/ml 的猪肺炎支原体。所有的猪每日都要进行检测并检查疾病的临床症状。

[0110] 攻击第一天后 30 天, 无痛处死全部猪并作尸检。将肺取出并进行评估。尸检测定包括评估支原体呼吸系统疾病相关的病理程度。每一片肺叶都要检测, 并画出病灶的草图以评估其占每片肺叶的百分比。并记录总的病灶百分数。

[0111] 表 1

[0112]

治疗组 接种物 数量 接种后 0 天 第 178 天¹ 攻击 第 179 天¹ 攻击 第 180 天¹ 攻击

T01	安慰剂	26	26	26	26	26
T02	疫苗	26	26	24 ²	22 ³	22 ³

[0113] ¹毒性猪肺炎支原体接种体

[0114] ²71 和 73 号猪由于丢失耳部标记而在攻击前从研究中除去, 因为这些猪会导致无法确定每只动物的身份。36 号猪由于麻醉并发症在第 178 天死亡。31 号猪由于麻醉并发症在第 179 天死亡。

[0115] 表 2 中总结了肺病灶结果。该结果显示疫苗接种的猪 (T02) 的肺炎所致肺病灶的最小均方值显著 ($P=0.0385$) 低于给予安慰剂的猪 (T01) (2.0 对 4.5%)。

[0116] 表 2. 总病变肺百分率的总结

[0117]

<u>治疗组</u>	<u>化合物</u>	<u>猪的数量</u>	<u>最小均方值</u>	<u>范围</u>
T01	安慰剂	26	4.5 ^a	0-36.75
T02	疫苗	22	2.0 ^b	0-13.75

[0118] ^{a,b}不同的上标值具有显著的统计学意义 ($P=0.0385$)。

[0119] 该结果显示, 将猪肺炎支原体菌苗 RESPISURE-1 给予大约 1 周龄的猪单疫苗接种, 可诱导出其对随后毒性猪肺炎支原体攻击的抵抗力。

[0120] 实施例 4

[0121] 评测猪抵御毒性猪肺炎支原体攻击的保护作用, 所述猪为于 3-8 日龄施以单剂量猪肺炎支原体菌苗 RESPISURE-1 的猪肺炎支原体血清型阴性的猪。

[0122] 在疫苗接种时或其前后,进行针对疫苗的五项复制效价实验。用与疫苗参照物相比的相对抗原量来测定 RP。疫苗参照物的 RP=1.0,包含大约 8000 单位的猪肺炎支原体抗原。五项实验的 RP 值分别为 5.42,3.96,4.71,5.49 和 4.36。

[0123] 第 0 天, T02 治疗组中的猪经肌肉接种剂量为 2ml 的猪肺炎支原体菌苗 RESPISURE-1。T01 组中的猪经肌肉接种剂量为 2ml 的安慰剂。在第 173,174 和 175 天,每只猪均经鼻接种剂量为 5ml 的 1:25 的攻击接种体悬液。这三天的每一天中,在接种时培养一等份攻击物,以确定不存在细菌污染。第二等份用反滴定法来确定攻击储存物中包含大约 10^6 CCU/ml 的猪肺炎支原体。所有的猪每日都要进行检测并检查疾病的临床症状。

[0124] 攻击第一天后 29 天,无痛处死全部猪并作尸检。将肺取出并进行评估。尸检测定包括评估支原体呼吸系统疾病相关的病理程度。每一片肺叶都要检测,并画出病灶的草图以评估每叶相加的总百分比。并记录总的病灶程度。

[0125] 表 3

[0126]

治疗组	接种物	数量	接种后 0 天	第 173 天 ¹ 攻击	第 174 天 ¹ 攻击	第 175 天 ¹ 攻击
T01	安慰剂	26	26	25 ²	24 ⁴	24
T02	疫苗	26	26	23 ³	20 ⁵	20

[0127] ¹毒性猪肺炎支原体

[0128] ²123 号猪由于慢性脓毒性多关节炎而在第 19 天被无痛处死。

[0129] ³222 号猪于第 40 天死亡。尸检发现大量心包积液和心外膜出血。102 号猪由于直肠脱垂而于第 95 天无痛处死。204 号猪于第 145 天死亡。由于尸体高度腐烂所以未作尸检。

[0130] ⁴244 号猪在第一天攻击后由于麻醉并发症于第 174 天死亡。

[0131] ⁵用 NEEA 对 3 只猪评分

[0132] 表 4 中总结了肺病灶结果。分析显示疫苗接种的猪 (T02) 的肺炎所致肺病灶的最小均方值显著 ($P=0.0001$) 低于给予安慰剂的猪 (T01) (0.3 对 5.9%)。

[0133] 表 4. 总肺病灶百分数的总结

[0134]

病变肺的百分数

治疗组	接种物	猪的数量	最小均方值	范围
T01	安慰剂	24	5.9 ^a	0-36
T02	疫苗	20	0.3 ^b	0-6

[0135] ^{a,b}不同的上标值具有显著的统计学意义 ($P=0.0001$)。

[0136] 该结果显示,将猪肺炎支原体菌苗 RESPISURE-1 给予猪单疫苗接种,可诱导出其对随后毒性猪肺炎支原体攻击的抵抗力。

[0137] 实施例 5

[0138] 测评猪抵御毒性猪肺炎支原体攻击的保护作用,所述猪为于 3-8 日龄施以单剂量猪肺炎支原体菌苗 RESPISURE-1 的猪肺炎支原体血清型阴性的猪。

[0139] 在疫苗接种时或其前后,进行针对菌苗的五项复制效价实验。用与疫苗参照物相比的相对抗原量来测定 RP。疫苗参照物的 RP=1.0,包含大约 8000 单位的猪肺炎支原体抗原。五项实验的 RP 值分别为 5.42,3.96,4.71,5.49 和 4.36。

[0140] 第 0 天, T02 治疗组中的猪经肌肉内接种剂量为 2ml 的猪肺炎支原体菌苗。T01 组中的猪经肌肉内接种剂量为 2ml 的安慰剂。在第 76,77 和 78 天,每只猪均经鼻接种(每鼻孔 2.5ml)剂量为 5ml 的 1:25 的攻击接种体悬液。这三天的每一天中,在接种时培养一等份攻击物,以确定不存在细菌污染。第二等份用反滴定法来确定攻击储存物中包含大约 10^6 CCU/ml 的猪肺炎支原体。所有的猪每日都要进行检测并检查疾病的临床症状。

[0141] 攻击第一天后 29 天,无痛处死全部猪并作尸检。将肺取出并进行评估。尸检测定包括评估支原体呼吸系统疾病相关的病理程度。每一片肺叶都要检测,并画出病灶的草图以评估其占每片肺叶的百分比。并记录总的病灶百分数。

[0142] 表 5 中总结了该实验设计。

[0143] 表 5

[0144]

治疗组	接种物	数量	免疫后 0 天	第 176 ¹ 天攻击	第 177 ¹ 天攻击	第 178 ¹ 天攻击
T01	安慰剂	26	26	23 ²	23	23
T02	疫苗	26	26	21 ³	21	21

[0145] ¹毒性猪肺炎支原体接种物

[0146] ²237 和 139 号猪于第一 1 天检测为猪肺炎支原体阳性。于第 14 天将其从研究中除去并被无痛处死。220 号猪由于母猪碾压于第 3 天死亡。

[0147] ³238,240 和 277 号猪于第一 1 天检测为猪肺炎支原体阳性。于第 14 天将其从研究中除去并被无痛处死。280 号猪由于食欲下降和萎靡于第 7 天无痛处死。177 号猪由于慢性衰竭综合症于第 40 天死亡。

[0148] 表 6 总结了肺病灶结果。全部分析显示出免疫接种的猪(T 02)的肺炎所致肺病灶百分率的最小均方值显著地(P=0.0001)低于施以安慰剂的猪(T01)(0.5 对 9.9%)。

[0149] 表 6. 总病变肺百分率总结

[0150]

病变肺百分比

治疗组	接种物	猪数目	最小均方值	范围
T01	安慰剂	23	9.9 ^a	0 至 40.5
T02	疫苗	21	0.5 ^b	0 至 5

[0151] ^{a,b}不同的上标值为统计学差异(P=0.0001)

[0152] 本申请还公开了以下内容:

[0153] 1. 一种在动物中治疗或预防因猪肺炎支原体感染而引发的疾病或病症的方法,该方法包括对约 3 至约 10 日龄的动物施用单剂有效量的猪肺炎支原体疫苗。

[0154] 2. 根据段落 1 所述的方法,其中所述猪肺炎支原体疫苗配剂为 灭活的、全部或部

分猪肺炎支原体细胞制剂。

[0155] 3. 根据段落 2 所述的方法,其中所述单剂量猪肺炎支原体疫苗每剂量包含约 1×10^6 至约 5×10^{10} 变色单位(CCU)。

[0156] 4. 根据段落 2 所述的方法,其中所述疫苗的施用量为约 0.5 至约 3.0ml。

[0157] 5. 根据段落 2 所述的方法,其中所述猪肺炎支原体细胞制剂为 RESPISURE-1。

[0158] 6. 根据段落 2 所述的方法,其中所述猪肺炎支原体疫苗还包含猪肺炎支原体以外的病毒或细菌抗原。

[0159] 7. 根据段落 6 所述的方法,其中所述病毒或细菌抗原选自猪流感病毒(SIV)、猪生殖和呼吸疾病病毒(PRRS 或神秘猪病),断奶后腹泻(PWD)和猪增生性肠炎(PPE)。

[0160] 8. 根据段落 2 所述的方法,其中所述猪肺炎支原体制剂经肌肉注射施用。

[0161] 9. 根据段落 1 所述的方法,其中所述猪在免疫接种后能被保护多至 25 周。

[0162] 10. 根据段落 1 所述的方法,其中所述猪肺炎支原体疫苗还包含佐剂。

[0163] 11. 根据段落 1 所述的方法,其中所述猪肺炎支原体疫苗为亚单位疫苗。

[0164] 12. 根据段落 12 所述的方法,其中所述亚单位疫苗包含一个或多个免疫原性多肽或蛋白质或所述多肽或蛋白质的免疫原性片段。

[0165] 13. 根据段落 13 所述的方法,其中所述多肽或蛋白质选自:P46, P65, P97, P102, P70, P50 和 P44。

[0166] 14. 根据段落 1 所述的方法,其中猪肺炎支原体疫苗包含一个或多个编码一个或多个免疫原性多肽或蛋白质或所述多肽或蛋白质的免疫原性片段的基因或核酸,且所述基因或核酸可在体内表达。

[0167] 15. 根据段落 15 所述的方法,其中所述基因或核酸选自:p46, p65, p97, p102, p70, p50, 和 p44。